昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，April 2005，48(2)：301 - 304　　ISSN 0454-6296

棉铃虫细胞色素 P450 CO 差光谱的测定

于彩虹[1,2]**，高希武**[1*]

（1. 中国农业大学农学及生物技术学院昆虫学系，北京　100094；
2. 中国矿业大学(北京校区)化学与环境工程学院，北京　100083）

摘要：采用经典的 CO 差光谱方法测定棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 细胞色素 P450 含量时发现，同一样品的多次平行测定结果间差异显著。进一步研究表明测定时通入 CO 后的间隔时间不同，计算出的 P450 含量存在 1 ~ 16 倍的差异。多次连续扫描结果表明 $A_{450nm-490nm}$ 与通入 CO 后到扫描的时间间隔呈钟形曲线，说明 CO 与 P450 的结合需要一定的时间，以 $A_{450nm-490nm}$ 最大值计算 P450 含量最为准确。

关键词：棉铃虫；细胞色素 P450；CO 差光谱

中图分类号：Q965　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2005)02-0301-04

Cytochrome P450 CO difference spectra in *Helicoverpa armigera* (Hübner)

YU Cai-Hong[1,2]，GAO Xi-Wu[1*] (1. Department of Entomology，College of Agronomy and Biotechnology，China Agricultural University，Beijing 100094，China；2. College of Chemistry and Environment Engineering，China University of Mining and Technology (Beijing)，Beijing 100083，China)

Abstract：The CO difference spectra of cytochrome P450 (P450) in midgut and fat body of cotton bollworm，*Helicoverpa armigera* (Hübner)，were investigated. The experiment indicated with traditional methods for quantifying cytochrome P450，the result was not easy to repeat even to the same sample. The interval between CO addition and measurement greatly influenced the value of $A_{450nm-490nm}$. There was one to sixteen-fold differences in optical density. In repetitive analysis on CO difference spectra of P450 in midgut and fat body，it was found that the optical density difference between 450 nm and 490 nm increased within a period of time and then decreased gradually. It was concluded that the parameter of the maximum optical density difference between 450 nm and 490 nm was most accurate in determining the content of P450.

Key words：*Helicoverpa armigera*；cytochrome P450；CO difference spectra

多功能氧化酶(又称单加氧酶)系统是生物体内脂肪酸、生物碱、激素等内源性化合物以及药物、植物毒素、杀虫药剂等外源性化合物的重要氧化代谢系统(冷欣夫等，2001)。细胞色素 P450(简称 P450)是多功能氧化酶系统中的末端氧化酶，具有活化氧分子和与底物结合后的双重功能(Stegeman and Livingstone，1998)。P450 通过对农药氧化代谢能力的增强引起害虫的抗药性(Hodgson，1985；Scott，1999)。昆虫体内 P450 含量的变化常常作为衡量害虫抗药性的指标之一。

通过高速和超速两步离心制备昆虫中肠组织微粒体，还原型的细胞色素 P450 与 CO 结合后在 450 nm 附近出现最大吸收峰，依据在 450 ~ 490 nm 间的吸光度之差和摩尔吸光系数(91 $L \cdot mmol^{-1} \cdot cm^{-1}$)计算 P450 含量是目前普遍采用的方法(Omura and Sato，1964)。但是在测定过程中都没有考虑到 CO 同 P450 结合时间对 P450 的含量测定是否有影响，本文作者在对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) P450 大量测定过程中发现通入 CO 到测定的间隔时间对 P450 的含量有很大的影响。本研究旨在探讨 CO 同 P450 结合时间对 P450 含量测定的影响，从而减少实验过程中测定的误差。

基金项目：国家重点基础研究发展规划‘973’项目(G2000016207)；国家自然科学基金项目(29832050，39970496)

作者简介：于彩虹，女，1973 年 4 月生，博士，讲师，从事昆虫毒理、环境毒理研究，E-mail：rainbow-01@263.net

* **通讯作者** Author for correspondence，E-mail：gaoxiwu@263.net.cn

收稿日期 Received：2004-04-08；**接受日期** Accepted：2004-08-04

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

棉铃虫于 1996 年采自山东，在完全不接触药剂的情况下，用人工饲料连续饲养 50 代。饲养的温度为（26 ± 1）℃，相对湿度为 70% ~ 80%，光周期 16L∶8D。

1.2 化学试剂及药剂

PMSF 含量 > 99%，购自德国 Merk 公司；二硫苏糖醇（DTT）含量为 99%，为美国 Promega 公司产品；甘油、EDTA、硫代硫酸钠均为分析纯，为北京化学试剂公司产品。

1.3 P450 酶液的制备

将棉铃虫 6 龄幼虫在冰盘上解剖中肠和脂肪体，中肠去掉内容物后在冰冷的 1.15% 的 KCl 中漂洗几秒钟，用滤纸吸干水分，脂肪体不用 KCl 漂洗。中肠或脂肪体加入一定量的 0.1 mol/L 的 pH 7.5 的磷酸缓冲液（含 1 mmol/L EDTA、0.1 mmol/L PMSF、0.1 mmol/L DTT、10% 甘油）进行匀浆，然后在 4℃，10 000 × g 离心 20 min，上清液用 3 层滤纸过滤作为 P450 酶液。酶浓度相当于每毫升缓冲液中 2 个中肠或脂肪体。

1.4 P450 CO 差光谱的测定

参照 Omura 和 Sato（1964）的方法，P450 酶液用硫代硫酸钠还原，室温下放置 3 min 后，用注射器通入 CO 1 min，用 Lambda Bio 40 UV/Vis 分光光度计在 400 ~ 500 nm 进行多次扫描（每次扫描的间隔时间为 1.2 min）。按照在 450 ~ 490 nm 间的吸光度之差和摩尔吸光系数（91 L·mmol^{-1}·cm^{-1}）计算 P450 的含量。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫中肠和脂肪体还原型 P450 CO 差光谱

图 1 为棉铃虫中肠和脂肪体还原型 P450 酶液的 CO 多次测定的光谱图，每次测定的间隔时间为 1.2 min。从图中不难看出棉铃虫中肠和脂肪体都得到了典型的 CO 差光谱图，即在 450 nm 处存在吸收峰，而且通入 CO 后间隔不同时间测量的光谱图的 450 ~ 490 nm 间的吸光度之差存在着较大的差异。

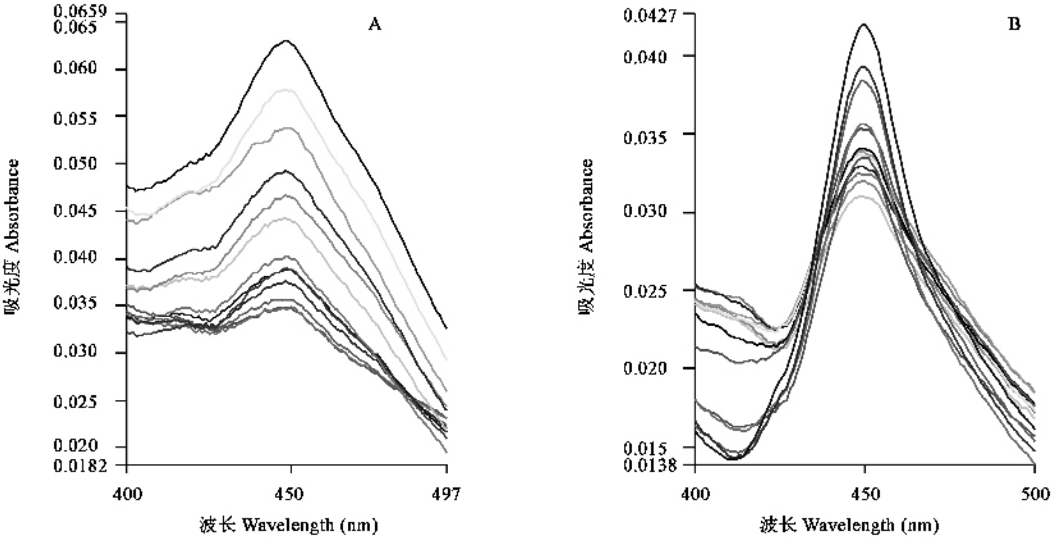

图 1 棉铃虫中肠（A）和脂肪体（B）还原型 P450 CO 差光谱图

Fig. 1 Difference spectra of carbon monoxide-reduced cytochrome P450 of midgut（A）and fat body（B）of *Helicoverpa armigera*

2.2 通入 CO 的时间对 P450 含量的影响

从图 2 可以看出在初期的几次测定过程中中肠和脂肪体 P450 酶液 CO 差光谱在 450 nm 出现了明显的吸收峰，并且 450 ~ 490 nm 间的吸光度之差同图 1 一样，吸光度随通入 CO 间隔时间的增加而增加。从棉铃虫脂肪体 P450 的 CO 差光谱图可以看出在测量的 34 min 内 CO 与 P450 的结合还没有达到最大值，得到的 P450 含量的测定结果低于实际结果；但是中肠随着时间的延长，即在图中标记的中期的测定光谱在 417 nm 附近开始出现吸收峰，这时

450～490 nm 间的吸光度之差还是增加的 到后期可以看出除了 450 nm 的吸收峰外，417 nm 的峰消失而在 420 nm 出现了明显的吸收峰，并且峰高随时间的延长而增加，而 450～490 nm 间的吸光度之差（$A_{450nm-490nm}$）在相应降低。420 nm 处出现吸收峰是 P450 失活的重要特征，P450 的失活，使细胞色素 P420 的量增加而 P450 的量相应减少，在光谱图上表现出 $A_{450nm-490nm}$ 的降低。图 3 表明，中肠 $A_{450nm-490nm}$ 与通入 CO 后的时间间隔呈钟形曲线，通入 CO 后第 5 min $A_{450nm-490nm}$ 的值为 0.002084，第 16 min 左右达到最大值，为 0.033281，相差 16 倍。

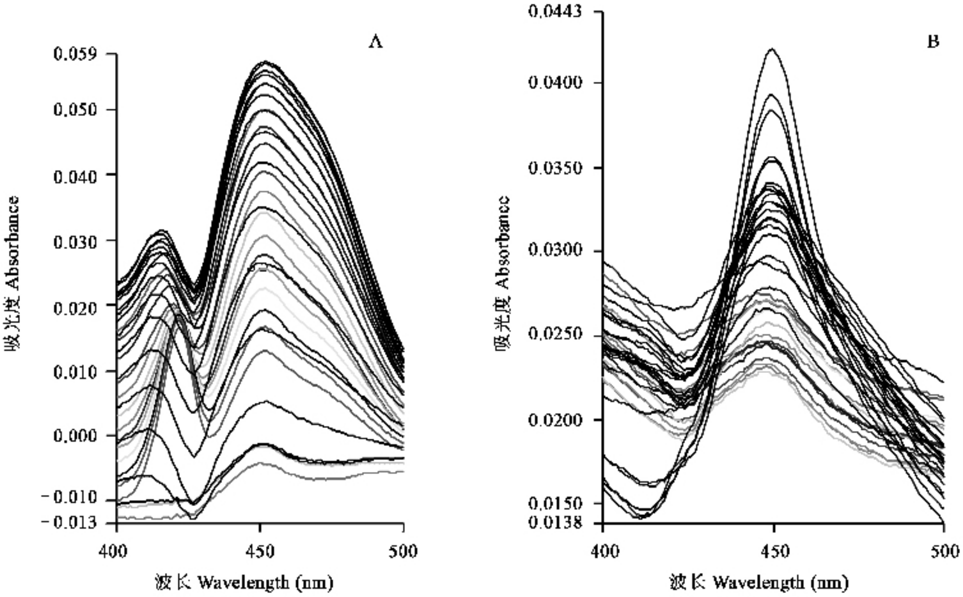

图 2　通入 CO 时间对棉铃虫中肠（A）和脂肪体（B）P450 含量的影响

Fig. 2　Effect of the interval after bubbling CO on levels of the $A_{450nm-490nm}$ in midgut (A) and fat body (B) of *Helicoverpa armigera* until inactivity of P450

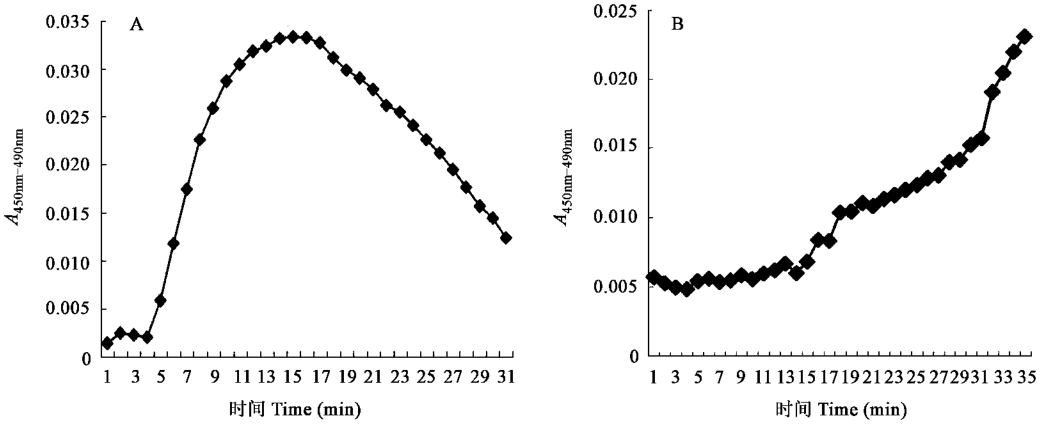

图 3　通入 CO 不同时间棉铃虫中肠（A）和脂肪体（B）P450 的 $A_{450nm-490nm}$

Fig. 3　$A_{450nm-490nm}$ at different intervals after bubbling CO in midgut (A) and fat body (B) of *Helicoverpa armigera*

3　讨论

还原型 P450 与 CO 结合后在 450 nm 处形成最大吸收峰，根据在波长 450～490 nm 间的吸光度之差和摩尔吸光系数（91 L·mmol^{-1}·cm^{-1}）来计算 P450 的含量，$A_{450nm-490nm}$ 的准确度直接影响到 P450 含量的测定结果。我们在研究植物次生物质对棉铃虫中肠和脂肪体 P450 含量的影响中发现，样品结果重复性差，不同处理样品结果缺少规律性，严格控制其他实验条件，也未取得理想的结果。因此，在详细地分

析了影响 P450 含量的 $A_{450nm-490nm}$ 值的因子(包括酶液的放置时间、研磨的方式等)后,发现 P450 含量测定过程中通入 CO 后不同时间测定的结果有着高达十几倍的差异,而在以往的多数文献中没有考虑到这一点。

通过对样品的连续多次扫描结合分析光谱质量和计算的 P450 含量,发现当 $A_{450nm-490nm}$ 值达到最大值时,其对应的光谱较好,在 450 nm 附近的吸光度高。并且 $A_{450nm-490nm}$ 和通入 CO 后到扫描的时间间隔呈钟形曲线。钟形曲线的下降阶段,在 420 nm 附近开始出现吸收峰,并逐渐加大,在 450 nm 附近的峰逐渐降低。说明虽然 P450 与 CO 的完全结合需要一定的时间,但时间过长,P450 酶会失活,在光谱上表现为 420 nm 附近出现吸收峰。由此可以看出,在测定 P450 含量的过程中,仅仅根据一次扫描得到的结果计算 P450 的含量是不准确的,尤其是在比较多个样品的 P450 含量时,通入 CO 后与开始扫描时的时间间隔不同可以使测定结果达到几倍的差异。在昆虫的抗性品系和敏感品系间抗性差异达到几百倍时,其体内的 P450 仅有几倍的差异,因此仅依据一次扫描结果是不可靠的,最好是通过多次扫描取 $A_{450nm-490nm}$ 与时间钟形曲线的最大值作为 P450 含量的测定结果,这样既减少了人为的测定误差,又增加了结果的准确度。

以往研究中对于昆虫 P450 的测定多是制备微粒体,本研究发现,棉铃虫中肠和脂肪体的微粒体上清液,尤其是脂肪体中的微粒体上清液中仍能测定出 P450 CO 差光谱图,而且无论是微粒体制备液还是微粒体上清液在测定其 P450 CO 差光谱图时都存在同本实验一致的结果,即通入 CO 的时间对 P450 的测得含量存在着数倍的影响,详细结果将陆续发表。

参 考 文 献 (References)

Hodgson E, 1985. Microsomal monooxygenase. In: Kerkut GA, Gilbert LC eds. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Physiology. Vol. 11. Oxford: Pergamon Press. 647 – 712.

Leng XF, Tang ZH, Wang YC, 2001. Molecular toxicology of insecticide and insect resistance. Beijing: China Agricultural Press. 9 – 15. [冷欣夫,唐振华,王荫长, 2001. 杀虫药剂分子毒理学及昆虫抗药性. 北京:农业出版社. 9 – 15]

Omura T, Sato R, 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: Ⅰ. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, 239: 2 370 – 2 378.

Scott JG, 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 29: 757 – 777.

Stegeman JJ, Livingstone DR, 1998. Forms and functions of cytochrome P450. *Comp. Biochem. Physiol.*, 212(C): 1 – 15.

(责任编辑:黄玲巧)